

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-334511

(43)Date of publication of application : 17.12.1996

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

G01N 21/17

G01N 21/27

(21)Application number : 07-162917

(71)Applicant : TERAMETSUKUSU KK

(22)Date of filing : 05.06.1995

(72)Inventor : MOTOKAWA HISASHI
TANAKA KAORU

(54) METHOD FOR MEASURING DEGREE OF COLORING OR IMMUNOCHROMATOGRAPHY TEST PIECE

(57)Abstract:

PURPOSE: To easily, automatically, and accurately determine quantity by obtaining a multilevel image corresponding to the brightness of each picture element, performing the correction processing of brightness distortion and noise elimination processing to it, and performing feature extraction processing.

CONSTITUTION: By picking up an image using an image sensor with a high resolution, an immunochromatography test piece can be measured as a chromatography image, which has been difficult by a conventional reaction rate meter. Further, by converting and measuring the obtained multilevel image, the disturbance of the chromatography image is corrected and reduced, thus obtaining a coloring index corresponding to the degree of coloring. Also, multiple items which cannot be easily measured visually can also be simultaneously, rapidly, and accurately measured.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998,2000 Japanese Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-334511

(43) 公開日 平成8年(1996)12月17日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	5 2 1		G 0 1 N 33/543	5 2 1
21/17			21/17	D
21/27			21/27	A

審査請求 未請求 請求項の数1 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平7-162917

(22) 出願日 平成7年(1995)6月5日

(71) 出願人 591029518

テラメックス株式会社

大阪府大阪市阿倍野区阪南町7丁目2番10号

(72) 発明者 本川 久志

滋賀県大津市竜が丘14-64

(72) 発明者 田中 馨

京都市山科区西野樫川町72-78

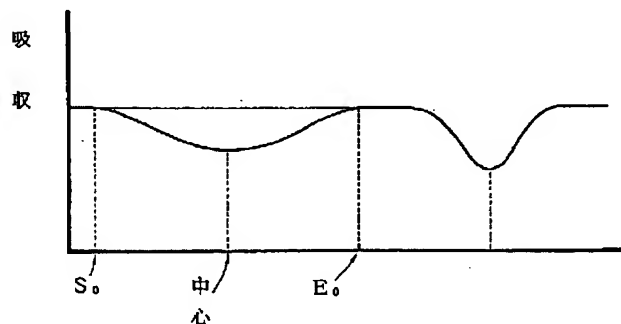
(74) 代理人 弁理士 永田 久喜

(54) 【発明の名称】 免疫クロマト試験片の呈色度の測定方法

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 免疫クロマト試験片の分析方法であって、解像度に優れ、迅速な測定を可能にする方法を提供する。

【構成】 試料中の特定物質の濃度を定量的又は定性的に求めるための分析方法であって、呈色した免疫クロマト試験片をイメージセンサを用いて撮像し、該イメージセンサの各画素の明度に対応した階調画像を求め、次いで階調画像に明度歪の補正処理と雑音除去処理を行ない、画像変換された階調画像の呈色部分の特徴抽出処理を行ない呈色度を求めるもの。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中の特定物質の濃度を定量的又は定性的に求めるための分析方法であって、呈色した免疫クロマト試験片をイメージセンサを用いて撮像し、該イメージセンサの各画素の明度に対応した階調画像を求め、次いで階調画像に明度歪の補正処理と雑音除去処理を行ない、画像変換された階調画像の呈色部分の特徴抽出処理を行ない呈色度を求めることを特徴とする免疫クロマト試験片の呈色度の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、免疫クロマト試験片の呈色度の測定方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】免疫クロマト試験片とは、試料中の特定物質（被検査物質）と抗原抗体反応を起こす抗体を展開層の所定位置に固定し、その位置に目的物質が展開した時に所定の呈色を生じさせるものである。

【0003】免疫法を用いると、通常の呈色試験法（通常の尿試験片等）と比較して、より微量な濃度の定量が可能となる。即ち、呈色試験法では、mg/dl 程度が測定限度であり、それ以下の濃度のものは測定できない。しかし、免疫法では、その1/100 ～1/1000の測定が可能である。よって、その濃度によっては、免疫法によってのみ測定できるものがあるのである。

【0004】以下免疫法について、妊娠試薬を例にとって説明する。しかし、これに限定するものでないことは、本発明の目的から明らかである。

【0005】妊娠の判定には、尿中にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）が検出されるか否かで診断される。また、非常に微量であるため、免疫法が用いられている。この原理は、試験片には所定位置に抗hCGモノクローナル抗体が固定され、hCGと試料塗布部（浸漬部）には抗hCG抗体結合粒子が塗布されている。この試料塗布部に、hCGを含有する尿を塗布すると、そこで抗hCG抗体結合粒子とhCGが結合し、複合体を形成する。この複合体が抗hCGモノクローナル抗体と結合し、その位置で色が定着する。

【0006】抗hCGモノクローナル抗体が固定されている位置は、予めわかっているためその位置で発色すれば（目視によって）、陽性（妊娠）と判定する。色自体は、抗hCG抗体結合粒子の色によって種々のものがある。

【0007】また、この免疫法は、ペーパークロマト法と組み合わせても好適である。ペーパークロマト法とは、溶液中の種々の物質は、滴下（又は浸漬）した位置から所定の位置まで浸透していくことを利用したものである。例えば、上記の例で説明すると、試料塗布部と判定部とが異なった場所であり、試料塗布部から判定部まで試料や目的成分が浸透して、判定部で目的成分のみが

固定されるものである。この方法では、滴下した試料自体の色や、その他の成分に判定部の色が影響を受けにくく、判定がより容易になる。

【0008】このように、免疫法を用いると非常に微量な成分の有無（定性的）が判定できました、抗hCG抗体結合粒子及び抗hCGモノクローナル抗体が非常に選択的に結合するため、目的成分以外のものを誤って測定するということもない。よって非常に信頼性のある判定が可能となる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、以上のような免疫法においても、次のような欠点があった。免疫クロマト試験片を目視により判定する場合において、目的測定物質の濃度が陽性と陰性を識別するカットオフレベル付近の濃度である場合には判定の再現性が悪くなりまた個人差が現れる。また、確実に判定できた場合においても、陽性或いは陰性の程度を知りたい場合や、その程度を知ることにより診断上有益な場合が多い。これを目視により行おうとすると、色見本との対比により判定する方法が考えられるが、陽性と陰性の判定における呈色の有無の識別に対し、呈色の度合を識別することは目視にとってより困難な識別であり、陽性と陰性の判定以上に判定の再現性が悪くなりまた個人差が現れ、診断上有益な結果が得られるとは考えにくい。

【0010】一方免疫クロマト試験片を装置により判定すれば、目視判定における再現性の悪さや個人差は改善されるはずである。装置化する方法としては、従来の呈色試験片用の反射率計を用いて呈色部分の反射率を測定することである。しかし、この方法は、一様に呈色した試験片を測定するものであり、直径3mm程度のスポットの反射率を測定するだけである。この方法は、そのスポットの部分の明度（反射率）が濃度と相関関係があるという前提である。しかし、免疫クロマト法では、そのような関係はなく、目的物質の濃度が増加した場合でもスポット部の反射率はほとんど変わらず、呈色する面積が広がる場合が多い。これでは、濃度を求めることはできない。

【0011】そこで、スポットで反射率を測定する光学測定系（又は試験片）を順次移動させて、1次元的に反射率を求めていくことも考えられる。この1次元反射率データ群から、全体の呈色程度を求めることも考えられる。

【0012】しかし、これでは装置が複雑化し、測定に時間がかかる欠点があるだけでなくスポット自体に面積を持った反射率計であることに変わりはなく、スポットを1mm程度に絞ったとしても、それだけの分解能しか得られない。

【0013】更に、1次元の反射率データ群が得られても、試験片のクロマト像は、ガスクロマトグラフ等のクロマト像と同質ではなく、試験片表面のざらつきによる

像の乱れや試験片自体のよじれや傾きやうねりによる像の乱れ等、免疫クロマト試験片特有の問題があり、上記のような装置化は不可能である。

【0014】そこで、この簡易な免疫法を用いて、簡単に定量ができ、且つ多数の検体を測定するための自動化も可能にしたものが、この業界では要望されてきている。

【0015】

【課題を解決するための手段】このような現状に鑑み、本発明者は鋭意研究の結果、本発明方法を完成させたものであり、その特徴とするところは、試料中の特定物質の濃度を定量的又は定性的に求めるための分析方法であって、呈色した免疫クロマト試験片をイメージセンサを用いて撮像し、該イメージセンサの各画素の明度に対応した階調画像を求め、次いで階調画像に明度歪の補正処理と雑音除去処理を行ない、画像変換された階調画像の呈色部分の特徴抽出処理を行ない呈色度を求める点にある。

【0016】本発明は、免疫クロマト試験片の呈色の程度を求める方法であり、その呈色の程度から目的物質の濃度に換算することは、同一装置内で行なっても、他の演算装置に呈色の程度を入力してそこで行なってもよい。

【0017】免疫クロマト法であるため、試験片には、抗体が固定され、測定物質と抗体結合する粒子が塗布されていることは当然である。この粒子が発色する成分であり通常は試料塗布（滴下、浸漬等）部に塗布されている。この抗体と抗体結合粒子は、目的とする物質によって異なることは当然であり、抗原抗体反応を起こすもの、結合複合体を作るものである。また、複数種類の異なる目的物質を同時に測定する多項目同時測定では、目的物質と反応するそれぞれの抗体結合粒子が、混合されて試料滴下部に塗布され、同様に反応するそれぞれの抗体が、判定部において別々の場所に固定されている。

【0018】本発明においては、この呈色程度を目視によらず自動的に機械で読み取るものである。その読み取り方法について説明する。免疫クロマト試験片の呈色部分には通常帯状に抗体が固定されている。従って、呈色も帯状である。また、多項目同時測定においては、帯状の呈色が間隔をあけて複数示される。イメージセンサを有する光学系を用いて、免疫クロマト試験片のこの呈色部分を包含して撮像するのである。

【0019】光学系は通常、照明用光源とレンズとフィルタからなる。照明下におかれた免疫クロマト試験片の像は、レンズによりイメージセンサ上に結像する。よって、イメージセンサの各画素には、試験片の各部分の明度に対応した電気信号が得られ、それを信号処理回路やコンピュータに入力することにより、該イメージセンサの各画素の明度に対応した階調画像を求める。フィルタは呈色部分の分光吸収特性の大きい波長を用い、光源と

試験片の間又は試験片とイメージセンサの間に挿入する。LED等の特定の波長を持つ光源を用いる場合や、分光機能を有するカラーイメージセンサを用いる場合では、フィルタは不要である。イメージセンサの位置分解能は、試験片上の寸法に換算して、通常数十 μm から数百 μm の分解能を有する。

【0020】階調画像とは、階調を持つ画素の集まりを言う。階調とは明るさの段階でありアナログ信号をデジタル信号に変換する時の分解能で決まり、8ビットで変換すれば256階調となる。

【0021】イメージセンサとしては、CCDが価格的にも性能的にも最も適している。イメージセンサは前記した通り、カラーイメージセンサでもモノクロイメージセンサでもよい。また、ビデオカメラのように2次元イメージセンサでも、1次元イメージセンサでもよい。

【0022】1次元イメージセンサで撮像する場合、帯状の呈色に対して直角方向に撮像することにより、クロマト像に対応する階調画像が得られる。2次元イメージセンサで撮像する場合、当然2次元の階調画像が得られるが、この画像は1次元で撮像した階調画像が2次元方向に複数集まったものと考えることができる。よって帯状の呈色方向に並ぶ画素同士の平均値をとり1次元の階調画像に変換することにより後の処理を簡素化することもできる。これにより、呈色にむらがあった場合や、試験片面にゴミや傷があった場合においては、その影響を1次元イメージセンサで撮像した場合に比べ軽減することができる。1次元イメージセンサで撮像する場合においても、イメージセンサ又は試験片を帯状の呈色方向に移動させながら複数回の撮像を行なうことにより2次元の階調画像を得ることもできる。

【0023】次に、画像変換と画像計測について述べる。ここで画像変換とは、明度歪の補正処理と雑音除去処理を言う。明度歪とは、均一な散乱面を持つNDペーパー等を撮像した場合に、得られる階調画像の各画素の階調が均一にならず歪み生ずることである。明度歪は、照明光学系の試験片面における照射光量の分布や照射角度成分の分布が均一でない場合に現れる。また、結像光学系では、イメージセンサ面において、レンズの光軸上の画素の明度に比べ、光軸を外れるに従い、対応する画素の明度は減少する。更に、イメージセンサの画素間の感度のばらつきや、信号処理回路の利得の画像内での偏りにより、明度むらとして現れる。このような明度歪を持つ階調画像の各画素の明度を均一にすることを、明度歪の補正処理という。一般的には、各画素に、予め求めた係数を掛けることにより補正を行ない、歪のない階調画像に変換する。

【0024】雑音除去処理とは、一般的には平滑化処理であり、先に述べた2次元階調画像を1次元階調画像に変換する場合では、帯状の呈色方向に並ぶ画素同士の平均値を求める平均化処理である。帯状の呈色に対して直

角方向の1次元階調画像では移動平均処理が好適である。特殊な雑音除去処理として、選択的雑音除去処理があげられる。2次元階調画像において、通常、帯状の呈色方向に並ぶ画素同士は同程度の階調を示すはずであるが、明らかな呈色のむらや、明らかな試験片面のゴミや傷がある場合、この限りではない。帯状の呈色方向の画素の階調について標準偏差を求める等の統計計算をすることにより、雑音の程度を知ることができ、雑音の大きいものについては、許容偏差値を外れる階調を示す画素を、選択的に除去することができるので、その影響を極めて軽減することができる。

【0025】特徴抽出処理とは、画像の特徴を定量化するために、面積、長さ、形状等の階調画像の中の図形の特徴を数値で表すことをいう。クロマト像のピークの形や雑音の程度により処理方法を選択するが、一般にはガスクロマトグラフのようにベースラインを求めた上で、ピーク的面積や高さ、幅等を求め、これを呈色指数とする。勿論、多項目同時測定ではそれぞれの項目に対応する呈色指数が求められる。ここで求めた呈色指数は試験片の呈色部分の呈色強度に対応しており、これは一般に目的物質の濃度をほぼ反映している。従って、通常、予め求められている濃度と呈色指数との検量線から、目的物質の濃度を定量的又は定性的に求められる。

【0026】以上のように、高い分解能を有するイメージセンサを用いて撮像する事により従来の反射率計では困難であった、免疫クロマト試験片をクロマト像として測定することが可能となり、更に、得られた階調画像を画像変換及び画像計測することにより、クロマト像の乱れを補正し、軽減し、呈色度に対応する呈色指数を求めることができる。また、目視では紛らわしく間違いやすい多項目同時測定においても、迅速、正確に測定を行なうことができる。

【0027】

【実施例】次に本発明の方法に用いる試験片と測定装置について、図面に示す実施例に基づいて説明する。図1は、本発明に用いる試験片1の1例を示し、(a)は平面図、(b)は断面図である。全体はプラスチックでカバーされており、試料滴下部2と判定部3に窓が設けられ、試料を吸収する部分が露出している。試料滴下部2は、吸収性の大きい不織布4であり、それに続いて抗体固定部(判定部)は濾紙5であり、所定の帯状部に抗体が固定されている。この場合、試料が抗体に届いたことをチェックするためのチェック抗体も右側に固定されている。この右側の部分が呈色すれば、試料が左側の固定部を通過していることが確かめられる。また、試料滴下部には、目的物質と複合体を作る抗体結合粒子が塗布されている。このような試験片にしているのは、自動装置への適用が容易なためと、展開や吸収を速めるためである。

【0028】次に本発明方法に用いる装置の1例につい

て説明する。この装置は、試料容器に入った試料中の特定微量成分の濃度を、連続自動測定するものである。ここでは、妊娠診断のhCGを定量するものを例にとって説明する。装置は、表示器、キーパネル、プリンタ、CCD、CPU、試験片導入部、光源から構成されている。これら装置自体は、特別なものである必要はなく、従来の自動尿分析装置と同様であり、本発明自体もこのような部分に特徴があるのではない。但し、従来の受光素子ではなく、イメージセンサが設けられている点が大きく異なる。

【0029】次に、この装置の測定とデータ処理について説明する。反応の結果は、陽性サンプルでのみ判定窓の中央付近に赤紫の薄い線が現れる。光学系には、赤紫の発色を感じる特定波長(565nm)のLEDを照明用として用い、CCDイメージセンサで計測するものである。手順は次の通りである。

(1) 反応像の読み取り

試験片をCCDイメージセンサにより、2次元的に撮像する。これを、横方向(呈色帯と直角方向)に10本の線上(幅0.05mm)で、各画素の光強度を求めて、10本の1次元階調画像を求め、それらに、予めN9.0のNDペーパーを撮像して求めた係数を、各画素について乗じることにより、明度歪の補正された10本の1次元階調画像を求める。この10本を平均して1本の1次元階調画像とする。これの、移動平均をとり、雑音を除去する。この雑音除去したものを読み取り反応像とする。この反応像を図2に示す。このグラフの左側の下向きピークはhCGの発色ピークであり、右側のピークはチェック用のピークである。この場合、右側にもピークが出ているため、所定の位置まで試料が届いているということである。

(2) 解析

読み取り反応像より判定窓の位置を検索する。尿中にhCGが存在する場合は判定窓の中心から±2mmの位置に赤紫の線が現れるので、判定窓の中心-2mm位置を S_0 とし、そこから2mmの位置を E_0 とする。 S_0 と E_0 を結ぶ直線と、反応線とで囲まれた部分の面積を求める。そして、 S_0 を0.1mmずつ移動させて、順次同様の面積を計算する。求められた21個の面積の最大値をこの試料の変位とする。この方法ではなだらかなピークでも確実な判定ができる。

【0030】これまで妊娠判定のhCGは、その有無しか判定できなかったが、本発明装置では、十分に定量が可能であった。

【0031】

【発明の効果】以上詳細に説明した本発明方法によると、呈色度の測定(読み取り)が画像として一括して捉えるため、瞬時にできる。また、免疫クロマトの利点である微量成分の判定が、熟練した技能を要せずに、簡単、自動、確実に行なえ、定量が可能となる。また、像

として読み込んで、その後データ処理するため、分解能がすぐれ正確な値が読み取れる。

【図面の簡単な説明】

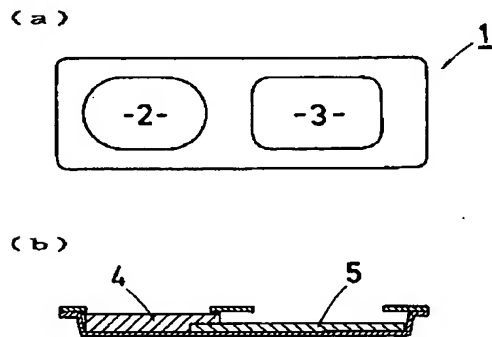
【図1】本発明に使用する試験片の1例を示すもので、(a)は平面図、(b)は断面図である。

【図2】吸収を示すグラフである。

【符号の説明】

- 1 試験片
- 2 滴下窓
- 3 判定窓
- 4 不織布
- 5 濾紙

【図1】



【図2】

